



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Patentschrift  
10 DE 101 29 369 C 1

51 Int. Cl. 7:  
C 08 B 31/12  
A 61 K 31/7028  
C 08 B 33/04  
C 08 B 35/04

21 Aktenzeichen: 101 29 369.0-43  
22 Anmeldetag: 21. 6. 2001  
43 Offenlegungstag: -  
45 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 6. 3. 2003

DE 101 29 369 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:  
Fresenius Kabi Deutschland GmbH, 61352 Bad  
Homburg, DE  
74 Vertreter:  
Luderschmidt, Schüler & Partner, 65189 Wiesbaden

72 Erfinder:  
Sommermeyer, Klaus, Dr., 61191 Rosbach, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:  
DE 690 12 747 T2

54 Wasserlösliches, einen Aminosucker aufweisendes Antibiotikum in Form eines Polysaccharid-Konjugats

57 Die aminozuckerhaltigen Antibiotika Amphotericin B, Daunorubicin und Doxorubicin sind trotz gravierender Nebenwirkungen von großem therapeutischen Nutzen. Das Antimykotikum Amphotericin B ist nephrotoxisch. Die Cytostatika Daunorubicin und Doxorubicin sind stark kardiotoxisch. Es sollten neue Arzneiformen dieser Antibiotika gefunden werden, bei welchen diese Nebenwirkungen reduziert sind und welche unkompliziert anwendbar sind. Die Arzneiformen sollen in hoher Ausbeute kostengünstig herstellbar sein.

Die neuen Arzneiformen sind Antibiotika-Stärke-Konjugate, wobei das Antibiotikum mit dem Polysaccharid an dessen reduzierendem Ende über eine Peptidbindung verknüpft ist. Verfahrensmäßig erfolgt diese Bindung über J<sub>2</sub>-Oxidation des Stärkederivats an seinem reduzierenden Ende in wässriger alkalischer Lösung und anschließender Kopplung des so oxidierten Stärkederivats an das Antibiotikum in organischer Lösung. Die erhaltenen Konjugate sind weniger toxisch. Der Polysaccharid-Anteil ist durch Serum- $\alpha$ -Amylase abbaubar und die Peptidbindung einem enzymatischen Angriff zugänglich.

Neue derivatisierte Antibiotika in Form von Stärke-Konjugaten.

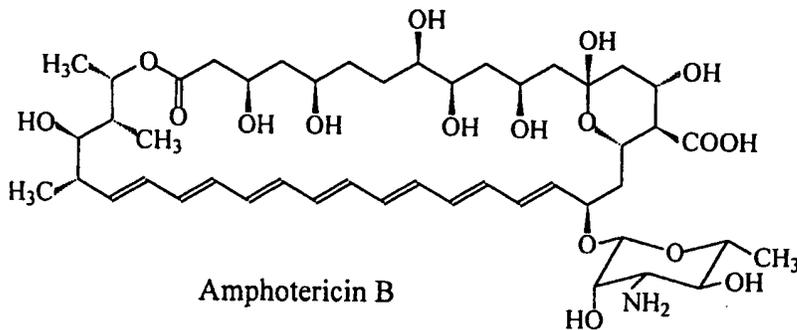
DE 101 29 369 C 1

## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft wasserlösliche, oral oder parenteral applizierbare Zubereitungen von einem Aminozucker aufweisenden Antibiotika in Form eines Konjugats mit einem Polysaccharid auf Basis von Stärke oder Stärkederivaten, insbesondere Hydroxymethylstärke, Hydroxyethylstärke und Hydroxypropylstärke, sowie ein Verfahren zu deren kostengünstiger Herstellung in hoher Ausbeute. Besonders bevorzugt als Polysaccharid ist Hydroxyethylstärke. Als Antibiotika mit einem Aminozucker kommen insbesondere Amphotericin B, Daunorubicin und Doxorubicin in Betracht, welche allesamt eine Aminogruppe in C<sub>3</sub>-Position des Aminozuckeranteils aufweisen.

[0002] Die aminozuckerhaltigen Antibiotika Amphotericin B, Daunorubicin und Doxorubicin finden in der Therapie breite Anwendung und stellen oft das Mittel der Wahl dar, obwohl sie teils gravierende Nebenwirkungen zeigen. Amphotericin B wird überwiegend parenteral appliziert, Daunorubicin und Doxorubicin müssen zwingend i. v. verabreicht werden.

[0003] Amphotericin B ist ein aus *Streptomyces nodosus* isoliertes Polyen-Antibiotikum. Chemisch handelt es sich um ein makrocyclisches Lacton (Makrolid) mit 7 konjugierten Doppelbindungen in all-trans-Konfiguration innerhalb eines 38-gliedrigen Lactonrings, an welchen über eine O-glykosidische Bindung der Aminozucker D-Mycosamin gebunden ist. Amphotericin B ist amphoter und besitzt lipophile und hydrophile Regionen im Molekül, welche es befähigen, mit den in der Cytoplasmamembran von Pilzen enthaltenen Sterolen Komplexe zu bilden, was zu einer Störung der Zellpermeabilität führt. Da Bakterienmembranen keine Sterole enthalten, ist die antibiotische Wirkung von Amphotericin B selektiv gegen Pilze gerichtet.



[0004] Wegen des breiten Wirkungsspektrums von Amphotericin B, das praktisch alle menschenpathogenen Pilze umfaßt, ist es für eine systemische Behandlung mykotischer Infektionen beim Menschen das Mittel der Wahl. Insbesondere bei Patienten, deren Immunsystem beeinträchtigt ist, wie z. B. bei HIV- oder Krebs-Patienten, hat die Behandlung der damit einhergehenden invasiven Pilzinfektionen in den letzten Jahren stark zugenommen.

[0005] Andererseits ist jedoch der Einsatz von Amphotericin B mit teils ziemlich massiven Nebenwirkungen verbunden. Bei generalisierten Mykosen und Organmykosen wird Amphotericin B i. v. appliziert, üblicherweise mit einer täglichen Dosis von 0,5 bis 0,7 mg/kg Körpergewicht. Da aber die Verträglichkeit von Amphotericin B von Patient zu Patient unterschiedlich ist, muß die Dosierung individuell eingestellt bzw. angepaßt werden. Darüber hinaus benötigen Patienten mit geschwächtem Immunsystem meist höhere Dosen als üblich, z. B. täglich 1 mg/kg Körpergewicht, die bei schwierigen Verlaufsformen – sofern verträglich – bis zu 1,5 mg/kg gesteigert werden können. Die parenterale Anwendungsdauer kann sich dabei von einigen Wochen bis zu mehreren Monaten hinziehen.

[0006] Im Laufe einer parenteralen Behandlung kommt es dann gewöhnlich zu infusionstypischen Reaktionen, wie z. B. Fieber, Erbrechen und Schüttelfrost, die gewöhnlich symptomatisch behandelt werden, so daß eine Unterbrechung der Infusionsbehandlung nicht erforderlich ist. Weit schwerwiegender sind jedoch die oftmals auftretenden Leber- und insbesondere Nierenfunktionsstörungen. So fällt etwa zu Beginn einer Therapie die glomeruläre Filtrationsrate stets um etwa 40% ab. Bei der Mehrzahl der Behandelten bleibt sie über die gesamte Therapiedauer hinweg erniedrigt. Entsprechend steigen Kreatinin im Serum und Harnstoff im Blut an. Gelegentlich sind sogar über die Therapiedauer hinaus irreversible Schädigungen zu beobachten. Nach zwei- bis dreiwöchiger Therapie tritt auch häufig Anämie auf, die zu Hämatokrit-Werten von 25 bis 30% führen kann. Die Blutbildveränderungen sind jedoch in der Regel nach Beendigung der Therapie wieder voll reversibel.

[0007] Wegen seiner Toxizität und Nebenwirkungen sollte Amphotericin B daher nur bei lebensbedrohlichen Umständen verabreicht werden. Andererseits stellt es jedoch bei den durch Störungen des Immunsystems – z. B. bei AIDS oder nach Organtransplantationen – auftretenden Mykosen häufig das einzig wirksame Mittel dar.

[0008] Trotz hydrophiler Domänen innerhalb des Moleküls weist Amphotericin als ganzes ausgeprägte hydrophobe Eigenschaften auf, so daß es im physiologischen pH-Bereich in Wasser praktisch unlöslich ist. Selbst in organischen Lösungsmitteln ist es nur schwer löslich. Daher stellen die derzeitigen Handelspräparate relativ kompliziert aufgebaute Arzneiformen dar, welche mit zusätzlichen Nachteilen behaftet sind. Mit einem geeigneten Lösungsvermittler, wie z. B. Na-Desoxycholat, läßt sich die Löslichkeit in Wasser erhöhen. So liegt z. B. das zur Infusion vorgesehene Originatorpräparat von BRISTOL-MYERS SQUIBB (in Deutschland unter der Handelsbezeichnung "Amphotericin B" erhältlich) als Trockensubstanz vor, welche in Wasser rekonstituiert werden muß und dann als mizellare Dispersion von Amphotericin B und Na-Desoxycholat in Wasser vorliegt. Um eine applikationsfertige Infusionslösung zu erhalten, kann die so erhaltene Stammlösung nur noch mit elektrolytfreien Trägerlösungen, wie z. B. einer 5% Glucoselösung, bis zur erwünschten Endkonzentration verdünnt werden.

[0009] Dieses Präparat weist zudem einen nur geringen therapeutischen Index auf, d. h. das Fenster zwischen effekti-

ver und toxischer Dosis ist sehr schmal. Darüber hinaus ist, trotz des relativ breiten Wirkungsspektrums von Amphotericin B, dieses Präparat bei bestimmten Krankheitsbildern wenig effektiv, weil die Wirksubstanz den Ort der mykotischen Infektion nicht oder nur in zu kleinen Konzentrationen erreicht, so daß Amphotericin B dort seine charakteristische antifungale Wirkung nicht oder nur unzureichend entfalten kann.

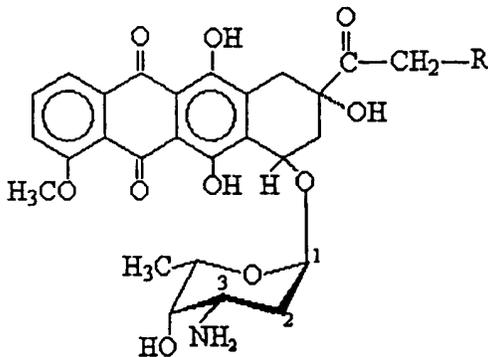
[0010] Um diese Nachteile des Originatorpräparats zu überwinden, wurde eine Reihe von Amphotericin B-Präparaten entwickelt, welche Lipid-Formulierungen darstellen, z. B. Lipidkomplexe mit Amphotericin B, kolloide Dispersionen von Cholesterylsulfat mit Amphotericin B und liposomal verpacktes Amphotericin B. Alle diese Arzneiformen weisen zwar einen größeren therapeutischen Index und eine höhere Verträglichkeit, insbesondere eine geringere Nephrotoxizität im Vergleich mit einer herkömmlichen Amphotericin B-Desoxycholat-Formulierung auf, weshalb sie auch in höheren Dosen verabreicht werden können, dennoch lassen sich bei hohen Dosen die oben beschriebenen Nebenwirkungen nicht ganz vermeiden.

[0011] Ein gravierender Nachteil solcher Lipidformulierungen von Amphotericin B ist jedoch in den sehr hohen Herstellungskosten und den damit verbundenen Handelspreisen zu sehen. Darüber hinaus müssen diese komplizierten Arzneiformen bis zu ihrer applikationsfertigen Form nach wie vor in umständlicher Weise rekonstituiert werden. Nicht zuletzt wegen dieser Nachteile ist trotz der verbesserten therapeutischen Breite bei den Lipidformulierungen des Amphotericins B eine breite Akzeptanz auf dem Markt ausgeblieben.

[0012] Als weitere Methode, Amphotericin B in eine wasserlösliche Form für Injektionszwecke zu überführen, ist in der Literatur die Bildung eines Amphotericin B-Arabinogalactan-Konjugats beschrieben (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 43 No. 8, 1999, 1975-1981). Arabinogalactan ist ein aus Lärchen gewonnenes wasserlösliches Polysaccharid aus Arabinose- und Galactose-Einheiten im Verhältnis 1 : 6. Die Bindung von Amphotericin B an Arabinogalactan erfolgt in 4 Schritten. Zunächst wird Arabinogalactan einer Perjodat-Oxydation unterzogen, wobei vicinale Hydroxylgruppen der Zuckereinheiten unter Ringspaltung in Dialdehyde überführt werden. Nach Reinigung der Reaktionsprodukte über eine Anionen-Austauschersäule wird die Amino-Gruppe des Mycosamins von Amphotericin B unter Bildung eines Imins (Schiffsche Base) an eine Aldehydgruppe gekoppelt und schließlich über eine Reduktion mit Hilfe von Na-Borhydrid die Imin-Gruppe in eine Amin-Gruppe sowie nicht umgesetzte Aldehydgruppen in Hydroxylgruppen überführt.

[0013] Die Kopplungsreaktion wird bei pH 11 ausgeführt. Dieser pH-Wert stellt einen Kompromiß zwischen der Ausbeute des gebildeten Konjugats einerseits und der Toxizität des Konjugats andererseits dar. Unterhalb von pH 10 ist Amphotericin B wasserunlöslich und die Ausbeuten sind gering. Ab pH 12 ist Amphotericin B relativ gut wasserlöslich, was höhere Ausbeuten ermöglicht, aber das erhaltene Produkt ist toxisch. Toxizität war ebenfalls zu beobachten, wenn der letzte Schritt der Na-Borhydrid-Reduktion unterblieb.

[0014] Die Antibiotika Daunorubicin und Doxorubicin gehören zur Gruppe der Anthracycline und unterscheiden sich lediglich durch eine Hydroxylgruppe. Sie sind in Wasser löslich. Doxorubicin wird aus Kulturen des Pilzes *Streptomyces peuceticus* var. *caesius* gewonnen, Daunomycin aus *Streptomyces peuceticus* oder *coeruleorubidus*.



Daunorubicin: R = H

Doxorubicin: R = OH

[0015] Durch ihren Tetracyclin-Rest sind Daunorubicin und Doxorubicin befähigt, unter Ausbildung sehr stabiler, über längere Zeit beständiger DNA-Interkalationskomplexe die DNA- und RNA-Synthese zu hemmen. Darüber hinaus bilden sie im Rahmen ihrer intrazellulären Metabolisierung mit Hilfe der Cytochrom-P-450-Reduktase und NADPH Semichinon-Radikale, welche ihrerseits weitere Radikalreaktionen auslösen (Superoxidation- und Hydroxylradikale). Dadurch gewinnen diese Antibiotika eine ausgeprägte cytotostatische Wirkung, weshalb sie als Cytostatika bei der Krebstherapie eingesetzt werden.

[0016] Da diese Antibiotika nach oraler Applikation nur unzureichend resorbiert werden, müssen sie (streng) i. v. in Kurzinfusionen über 10 bis 15 Minuten verabreicht werden. Ihre Verteilung im Organismus erfolgt schnell, wobei die höchsten Konzentrationen in Herz, Lunge, Milz und Niere nachgewiesen wurden.

[0017] Ihre schnelle Verteilung im Organismus in Verbindung mit der Bildung reaktiver Radikale durch Metabolisierung scheint eine der Ursachen für die ausgeprägten toxischen Nebenwirkungen zu sein, wodurch insbesondere das Herz in Mitleidenschaft gezogen wird.

[0018] Sowohl Doxorubicin als auch Daunorubicin sind ausgesprochen kardiotoxisch. Insbesondere die Kardiotoxizität vom Spättyp, welche eine dosisabhängige kumulative Organtoxizität darstellt, ist in der Regel irreversibel und oftmals

lebensbedrohend. Bei Überschreiten einer maximalen kumulativen Gesamtdosis, welche bei Erwachsenen bei 550 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche liegt, steigt die Inzidenz der anthracyclininduzierten Kardiomyopathie rasch an. Daher besteht ab einer Gesamtdosis von 550 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche eine etwa 5% Risiko für das Auftreten einer schweren Herzinsuffizienz. Ist diese kumulative Gesamtdosis erreicht, muß die Therapie unterbrochen werden.

5 [0019] Die Druckschrift DE 690 12 747 T2 offenbart ein wasserlösliches Konjugat eines Polymyxins und eines Trägers, wie beispielsweise ein Polysaccharid, wobei das Konjugat eine Größe aufweist, die für die Verwendung im systemischen Kreislauf geeignet ist. Weiterhin wird die Verwendung dieses Konjugates zur prophylaktischen oder heilenden therapeutischen Anwendung als Endotoxin-neutralisierendes Mittel, insbesondere als antifugales Mittel und/oder als antibakterielles Mittel. Hinweise auf die Lehre der vorliegenden Erfindung können dieser Druckschrift jedoch nicht entnommen werden.

10 [0020] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, für solche aminozuckerhaltigen Antibiotika Arzneiformen zur Verfügung zu stellen, in welchen die spezifischen toxischen Nebenwirkungen reduziert sind, welche eine gleichmäßigere, kontrollierte Verbreitung im Organismus gewährleisten und damit eine höhere Dosierung zulassen und welche dennoch einfach anzuwenden sind. Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein kostengünstiges

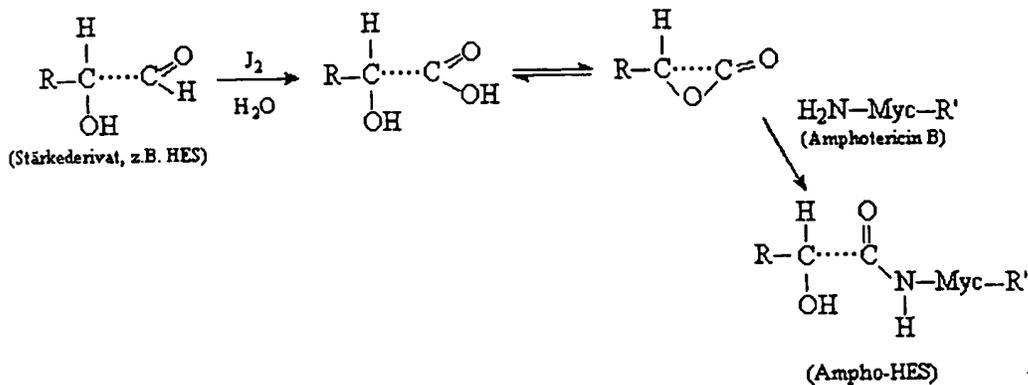
15 Verfahren zur Herstellung dieser Arzneiformen mit hoher Ausbeute zur Verfügung zu stellen.  
 [0021] Überschenderweise wurde gefunden, daß sich diese Aufgaben mit einem Konjugat von Stärke oder Stärkederivaten mit solchen Antibiotika lösen läßt. Als Stärke oder Stärkederivate kommen Amylose (unverzweigt nur mit  $\alpha$ -1,4-glykosidischer Verknüpfung) und/oder Amylopektin (verzweigt, zusätzlich mit  $\alpha$ -1,6-glykosidischer Verknüpfung) sowie insbesondere hydroxyalkylierte Stärke in Betracht. Bei Verwendung von Amylose oder Amylopektin wird im Handel erhältliche sog. "lösliche" Stärke eingesetzt.

20 [0022] Bei dem erfindungsgemäß bevorzugten Einsatz der hydroxyalkylierten Stärken Hydroxymethylstärke, Hydroxyethylstärke und Hydroxypropylstärke kann das mittlere Molekulargewicht (Gew.-Mittel  $M_w$ ) im Bereich zwischen 2000 und  $2 \cdot 10^6$  Dalton liegen. Der mittlere Polymerisationsgrad soll jedoch mindestens 15 betragen und in einer bevorzugten Ausführungsform bis ca 3000 reichen (entsprechend einem mittleren Molekulargewicht von ca.  $5 \cdot 10^5$ ). Insbesondere bevorzugt ist der Einsatz von Hydroxyethylstärke.

25 [0023] Die im Folgenden gemachten Ausführungen mit Hydroxyethylstärke als besonders bevorzugter Ausführungsform gelten in analoger Weise auch für Hydroxymethylstärke und Hydroxypropylstärke.

30 [0024] Bevorzugt soll in einem erfindungsgemäßen Antibiotikum-HES-Konjugat das Molekulargewicht der HES über der Nierenschwelle für HES liegen, d. h. über 70000 Dalton. Besonders bevorzugt ist eine HES der Spezifikation 130/mit einem mittleren Molekulargewicht von 130000 Dalton. Der Substitutionsgrad MS liegt vorzugsweise im Bereich von 0,1 bis 0,8. In bevorzugter Ausführungsform liegt der Substitutionsgrad im Bereich von 0,3 bis 0,5. Das bevorzugte C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>-Verhältnis liegt im Bereich von 2 bis 12, in besonders bevorzugter Ausführungsform im Bereich von 5 bis 11. Dabei kann HES sowohl unverzweigt nur mit überwiegend  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Verknüpfungen vorliegen als auch verzweigt mit sowohl  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Verknüpfungen als auch  $\alpha$ -1,6-glykosidischen Verknüpfungen.

35 [0025] In einem erfindungsgemäßen Konjugat erfolgt verfahrensmäßig die Bindung des Polysaccharids an die Aminogruppe des Aminozuckers des Antibiotikums, indem die freie, reduzierende Aldehydgruppe des endständigen Polysaccharid-Moleküls, vorzugsweise mit J<sub>2</sub>, zu einer Aldonsäuregruppe oxydiert wird, welche ihrerseits mit einer freien Hydroxylgruppe der endständigen Zuckereinheit, vorzugsweise am C<sub>4</sub>-Atom der endständigen Zuckereinheit, einen Lactonring ausbildet, der dann weiter mit der Aminogruppe des Aminozuckers des Antibiotikums eine Peptidbindung eingehen kann. Im Gegensatz zur Bildung einer Schiffschen Base aus den von einer Perjodat-Oxidation stammenden Aldehydresten des Arabinogalactans mit der Aminogruppe des Aminozuckers läßt sich die erfindungsgemäße Kopplungsreaktion des Oxydationsprodukts am reduzierenden Ende von HES mit der Aminogruppe des Aminozuckers (z. B. Mycosamin im Falle von Amphotericin B) mit großer Ausbeute in einem organischen Lösungsmittel, z. B. DMSO, ausführen, in welchem z. B. das Antibiotikum Amphotericin B löslich ist.



[0026] Diese Kopplungsreaktion erwies sich als außerordentlich selektiv und führte mit hoher Ausbeute zu einem Antibiotikum-Stärke-Konjugat, welches, anders als bei einer Perjodatoxidation, ein Molverhältnis zwischen Antibiotikum und Polysaccharid von 1 : 1 ergibt.

65 [0027] Das erhaltene Konjugat erwies sich überraschenderweise auch als nicht toxisch, so daß sie auch oral applizierbar sind. Die Kopplung des Polysaccharid-Trägers, insbesondere von HES, an das Antibiotikum bewirkte auch im Falle des an sich wasserunlöslichen Amphotericin B, daß das Konjugat insgesamt über eine ausreichende Wasserlöslichkeit verfügt. Dies hat zur Folge, daß die Lösung des Konjugats bzw. die Verdünnung auf die gewünschte applizierbare End-

konzentration auch mit elektrolythaltigen Lösungsmitteln bzw. Gemischen (z. B. einer Mischung aus isotonischer Kochsalzlösung und Glucoselösung) erfolgen kann. Da außerdem das erhaltene Konjugat nicht mehr toxisch ist, lassen sich damit höhere Dosen, z. B. für das Amphotericin B-Konjugat Tagesdosen bis zu 15 mg Amphotericin B-Anteil, applizieren.

[0028] Weil Hydroxyethylstärke ohnedies in großen Dosen intravenös als Plasmaexpander appliziert werden kann, sind bei der Kopplung von HES und Amphotericin B nicht umgesetzte Anteile von HES physiologisch unbedenklich und brauchen daher nicht eigens vom Reaktionsprodukt abgetrennt zu werden, was bei der Synthese von großem ökonomischem Vorteil ist. Im Falle des Amphotericin B ist auch keine abschließende Hydrierung erforderlich, um das gebildete Konjugat weniger toxisch zu machen. Darüber hinaus wurde überraschenderweise gefunden, daß ungebundene Hydroxyethylstärke an sich auf Amphotericin B sogar eine solubilisierende Wirkung ausübt, wodurch sich mit überschüssiger HES eine zusätzliche Stabilisierung des antimykotischen Wirkstoffs erzielen läßt.

[0029] Ein weiterer Vorteil eines erfindungsgemäßen Antibiotikum-HES-Konjugats besteht darin, daß der Polysaccharid-Anteil durch Serum- $\alpha$ -Amylase abbaubar ist. Dieser Abbau ist in der einschlägigen Literatur zur Pharmakokinetik der als Plasmaexpander eingesetzten HES ausführlich beschrieben. Darüber hinaus ist auch die Peptidbindung zwischen dem Polysaccharid-Anteil und dem Antibiotikum in vivo einem enzymatischen Angriff prinzipiell zugänglich.

[0030] Wie sich aus Untersuchungen an dem als Leit-Mikroorganismus aus dem Spektrum der möglichen Pilzinfektionskeime bekannten *Candida albicans* zeigte, wiesen die erfindungsgemäßen Konjugate von Amphotericin B den Lipidformulierungen vergleichbare Wirksamkeiten auf. Im Hämolysetest an Schafserythrocyten konnte demonstriert werden, daß die in-vitro-Toxizität eines Amphotericin B-HES-Konjugats wesentlich geringer ist als bei handelsüblichen Amphotericin B-Desoxycholat-Formulierungen.

[0031] Ein maßgeblicher Vorteil eines erfindungsgemäßen Antibiotikum-HES-Konjugats ist darin zu sehen, daß sich durch geeignete Auswahl von Molekulargewicht, Substitutionsgrad, Substitutionsmuster und Verzweigungsgrad der eingesetzten HES die pharmakokinetischen Eigenschaften des erhaltenen Konjugats praktisch maßgeschneidert auf die Bedürfnisse eines jeweiligen Patienten einstellen lassen.

[0032] In den folgenden Beispielen wird das Herstellungsverfahren und die hämolytische Wirkung der bevorzugten Antibiotikum-HES-Konjugate näher erläutert.

#### Beispiel 1

##### Oxydation von HES 130 kD

[0033] 10 g HES (130 kD) werden in ein Reaktionsgefäß gegeben und in einem möglichst geringen Volumen Wasser in Lösung gebracht. Zu dieser Lösung werden unter Rühren (Magnetrührer) 2 ml einer 0,1 N Jod-Lösung ca. 3 ml einer 0,1 N NaOH-Lösung gegeben. Die Mischung wird solange gerührt, bis die Farbe, die  $J_2$  anzeigt, verschwunden ist. Die Zugabe von Jod-Lösung und/oder NaOH-Lösung wird mehrmals wiederholt bis insgesamt 10 ml 0,1 N Jod-Lösung und 20 ml 0,1 N NaOH-Lösung zugegeben worden sind. Die erhaltene Lösung wird sodann über eine  $Na^+$ -Ionenaustauschersäule (Amberlite IR 120) gegeben und anschließend in einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlußgrenze von 4-6 kD über einen Zeitraum von 20 h gegen destilliertes Wasser dialysiert. Das dialysierte Produkt wird lyophilisiert und der Oxidationsgrad mit Hilfe der Methode von SOMOGYI ermittelt.

##### Ermittlung des Oxidationsgrades

[0034] Zur Bestimmung des gebildeten oxydierten HES (ox-HES) wurde das Verfahren von SOMOGYI herangezogen (Meth. Carbohydrate Chem., 1, 384-386, 1962). Das Verfahren beruht auf der Ermittlung der freien Aldehyd-Gruppen über die Reduktion von  $Cu^{2+}$  zu  $Cu^+$ .  $Cu^+$  wird mit Hilfe von aus Iodid und Iodat gebildetem Iod wieder zu  $Cu^{2+}$  oxidiert. Überschüssiges Iod wird sodann mittels Thiosulfat titriert.

#### Beispiel 2

##### Synthese eines Amphotericin B-HES-Konjugats

[0035] In einem Reaktionsgefäß werden 650 mg ( $1,5 \cdot 10^{-5}$  Mol) getrocknetes ox-HES (130 kD, Oxidationsgrad ca. 100%) und 2,8 mg ( $3,0 \cdot 10^{-6}$  Mol) Amphotericin B unter Rühren (Magnetrührer) in ca. 4 ml wasserfreiem DMSO bei Raumtemperatur unter  $N_2$ -Atmosphäre gelöst. Unter Lichtausschluß wird die Mischung 24 h lang bei 70°C reagieren gelassen. Die Aufarbeitung des Reaktionsprodukts erfolgt unter Lichtausschluß nach Zugabe von 10 Vol.  $H_2O$  mittels Dialyse gegen  $H_2O$  über einen Zeitraum von 48 h bei 4°C unter 4-maligem Wechseln des Wassers. Das anschließend lyophilisierte Produkt ergab ein schwach gelbliches Pulver.

[0036] Das Kopplungsverfahren wurde mit 3 weiteren Ansätzen wiederholt, wobei sich eine reproduzierbare Ausbeute für die Kopplungsreaktion von ca. 70% ergab. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1

	oxHES	Ampho B	wasserfreies DMSO	Reaktionszeit und -temperatur	Reaktionsbedingungen	Ausbeute an Ampho-HES nach Dialyse	
5	Ansatz 1	650 mg ( $1,5 \cdot 10^{-5}$ Mol)	2,8 mg ( $3,0 \cdot 10^{-6}$ Mol)	$\approx$ 4 ml	24 h 70°C	im Dunkeln unter N <sub>2</sub>	460 mg
10	Ansatz 2	10,0 g ( $2,4 \cdot 10^{-4}$ Mol)	44,0 mg ( $4,7 \cdot 10^{-5}$ Mol)	$\approx$ 40 ml	24 h 70°C	im Dunkeln unter N <sub>2</sub>	7,0 g
15	Ansatz 3	12,0 g ( $2,8 \cdot 10^{-4}$ Mol)	52,0 mg ( $5,6 \cdot 10^{-5}$ Mol)	$\approx$ 30 ml	24 h 70°C	im Dunkeln unter N <sub>2</sub>	8,4 g
20	Ansatz 4	7,2 g ( $1,7 \cdot 10^{-4}$ Mol)	31,2 mg ( $3,4 \cdot 10^{-5}$ Mol)	$\approx$ 20 ml	24 h 70°C	im Dunkeln unter N <sub>2</sub>	5,1 g

[0037] Die erhaltenen Amphotericin B-HES-Konjugate wurden über ihr UV-Spektrum charakterisiert (0,5 g/5 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>) und zeigten im Bereich von 300–400 nm die für polymere bzw. mizellare Wechselwirkungen von Amphotericin B typischen Banden. Im Gegensatz zu freiem Amphotericin B, das in Wasser praktisch unlöslich ist, wiesen die erhaltenen Amphotericin-HES-Konjugate eine Wasserlöslichkeit von > 0,1 g/5 ml H<sub>2</sub>O auf.

[0038] Mit Hilfe von LALLS-GPC (Low Angle Laser Light Scattering in Kombination mit Gel-Permeations-Chromatographie) wurden folgende GPC-Kennndaten bestimmt:

Gewichtsmitteltes Molekulargewicht  $M_w$ : 102.700

Zahlenmittel des Molekulargewichts: 36.050

Spitzenfraktion (10%): 24.050

Bodenfraktion (90%): 13.800.

[0039] Diese Kennndaten entsprachen im wesentlichen den Kennndaten der verwendeten HES.

### Beispiel 3

#### Hämolyse-Vergleichstest des Amphotericin B-HES-Konjugats

[0040] Die hämolytische Wirkung des erfindungsgemäßen Ampho-HES-Präparats wurde im Vergleich mit einer handelsüblichen Amphotericin B-Desoxycholat-Formulierung ("Amphotericin B" von Bristol-Meyers-Squibb, Chargen-Bezeichnung: A068), dessen Wirkstoff ab einer Konzentration von 8 µg/ml hämolytisch sein soll (R. Falk et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, 1975–1981), ermittelt.

[0041] Stammlösung für erfindungsgemäßes Präparat: 11,61 g Ampho-HES (entsprechend einem Gewichtsanteil von 50 mg Amphotericin B) wurden in 50 ml 5% Glucose-Lösung (Chargenbez.: 9233A4 der Fa. Braun Melsungen) gelöst. Der Wirkstoffgehalt der so hergestellten Stammlösung betrug 1 mg Amphotericin B pro ml. Von dieser Stammlösung wurden gemäß Tabelle 2 drei Verdünnungen hergestellt und ebenfalls auf ihre hämolytische Wirkung untersucht.

[0042] Handelsübliches Vergleichspräparat (Amphotericin B-Desoxycholat-Formulierung): Eine Flasche à 50 mg wurde mit 10 ml A. a. injectabilia (Chargenbez.: 0514A63 der Fa. Braun Melsungen) gelöst und in 5% Glucoselösung auf 0,12 mg/ml Amphotericin B verdünnt.

[0043] Herstellung der Erythrocytensuspension: Frisch entnommenes humanes Blut wurde etwa mit dem 5-fachen Volumen steriler 0,9% NaCl-Lösung (Chargenbez.: 9055A64 der Fa. Braun Melsungen) verdünnt und 5 Minuten lang bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 2000 zentrifugiert. Danach wurde die überstehende Lösung abgesaugt und die sedimentierten Erythrocyten noch zweimal auf die gleiche Weise behandelt.

[0044] Die so gewaschenen Erythrocyten wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und – sofern erforderlich – mit steriler 0,9% NaCl-Lösung auf eine Endkonzentration von ca.  $5 \cdot 10^8$  Erythrocyten pro ml nachverdünnt. Diese Suspension ist laut DIN-Morm bei Raumtemperatur bis zu max. 6 Stunden verwendbar.

[0045] Hämolyse-Vergleichstest: Je 5 ml der zu prüfenden Lösungen wurden mit 1 ml der obigen Erythrocytensuspension vermischt, in ein gereinigtes Zentrifugenröhrchen überführt und 20 Minuten lang in einem Wasserbad bei  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde 5 Minuten bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 2000 zentrifugiert.

[0046] Von der überstehenden Flüssigkeit wurde die Extinktion gemessen. Als Negativkontrollen dienten jeweils 5 ml der 0,9% NaCl-Lösung und der 5% Glucose-Lösung, welche mit 1 ml der Erythrocytensuspension vermischt, ebenfalls 20 Minuten lang bei  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  inkubiert und dann wie oben zentrifugiert wurden.

[0047] Zur Prüfung auf Hämolyse wurden in einem Photometer die Extinktionen der jeweiligen Überstände gegen die Negativkontrollen bei einer Wellenlänge von 576 nm unter Verwendung einer Küvette mit 10 mm Schichtdicke gemessen. Auf Grund der unterschiedlichen Färbungen der Lösungen wurden zum Vergleich von den Lösungen ohne Erythrocytensuspension ebenfalls die Extinktion gemessen.

[0048] Die Ergebnisse der diversen Testansätze sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Prüflösung	Konzentration Amphotericin B der Lösung mg/ml	Konzentration Amphotericin B im Testansatz mg/ml	Extinktion 576 nm	Extinktion 576 nm ohne Erythrocyten
0,9% NaCl	–	–	0,015	0,000
5% Glucose	–	–	0,016	0,000
Handelspräparat	0,12	0,1	2,271 <sup>*)</sup>	0,008
Ampho HES	0,12	0,1	0,027	0,033
Ampho HES	0,24	0,2	0,061	0,076
Ampho HES	0,48	0,4	0,274 <sup>*)</sup>	0,151
Ampho HES (Stammlösung)	1,00	0,83	2,452 <sup>*) **)</sup>	0,288

\*) Lösungen im Überstand rot gefärbt

\*\*\*) Wegen erhöhter Viskosität nach Zentrifugieren noch intakte Erythrocyten im Überstand mikroskopisch nachweisbar

[0049] Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, zeigt die getestete, im Handel erhältliche Amphotericin B-Desoxycholat-Formulierung bereits bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml im Testansatz unter den obigen Testbedingungen stark hämolytische Wirkung. Der Überstand hatte bei 576 nm eine Extinktion von 2,271 und war stark rot gefärbt.

[0050] Im Vergleich dazu war beim erfindungsgemäßen Ampho-HES-Präparat bis zu einer Konzentration von 0,2 mg Amphotericin B pro ml keine hämolytische Wirkung zu beobachten. Erst bei einer Konzentration von 0,4 mg/ml war im Überstand des Testansatzes im Vergleich mit der Negativkontrolle eine leichte Rotfärbung zu erkennen, was sich auch in den Extinktionswerten bemerkbar machte. Bei dieser Amphotericin B-Konzentration im Testansatz liegt demnach eine leichte hämolytische Wirksamkeit vor. Eine starke hämolytische Wirksamkeit durch das Testpräparat war bei einer Konzentration von 0,83 mg/ml zu erkennen, wo der Überstand stark rot gefärbt war. Daneben ließen sich im Überstand auch noch mikroskopisch wenige intakte Erythrocyten nachweisen, die wegen der hohen Viskosität während der Sedimentationszeit noch nicht ins Pellet sedimentieren konnten.

#### Beispiel 4

##### Synthese eines Daunorubicin-HES-Konjugats

[0051] In einem Reaktionsgefäß wurden 650 mg ( $1,5 \cdot 10^{-5}$  Mol) getrocknetes ox-HES (130 kD, Oxidationsgrad ca. 100%) und 0,8 mg ( $3,0 \cdot 10^{-6}$  Mol) Daunorubicin unter denselben Verfahrenbedingungen wie in Beispiel 2 reagieren gelassen und wie in Beispiel 2 weiterbehandelt. Auch hier wurde eine reproduzierbare Ausbeute von ca 72% erhalten.

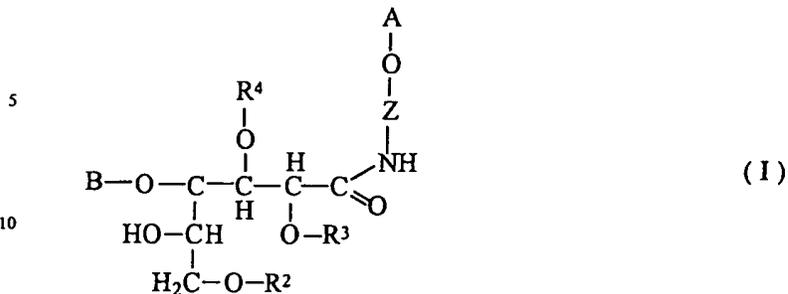
#### Beispiel 5

##### Synthese eines Doxorubicin-HES-Konjugats

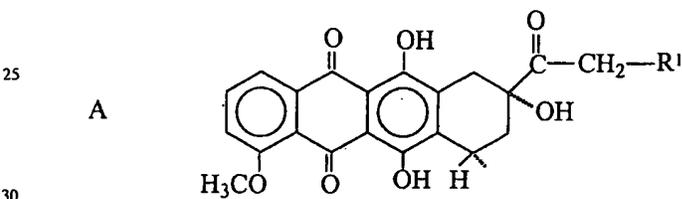
[0052] In einem Reaktionsgefäß wurden 650 mg ( $1,5 \cdot 10^{-5}$  Mol) getrocknetes ox-HES (130 kD, Oxidationsgrad ca. 100%) und 0,8 mg ( $3,0 \cdot 10^{-6}$  Mol) Doxorubicin unter denselben Verfahrenbedingungen wie in Beispiel 2 reagieren gelassen und wie in Beispiel 2 weiterbehandelt. Die erzielte Ausbeute betrug ebenfalls ca. 70%.

#### Patentansprüche

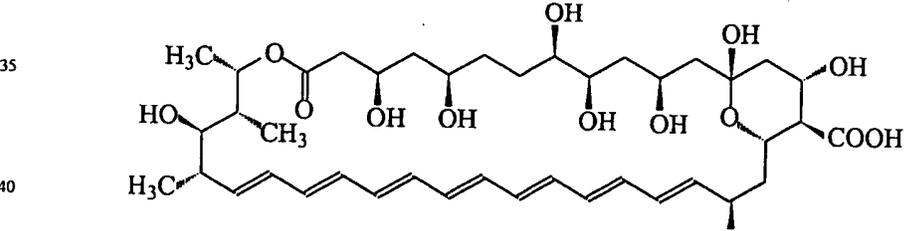
1. Wasserlösliches, einen Aminozucker aufweisendes Antibiotikum-Derivat in Form eines Polysaccharid-Konjugats der allgemeinen Formel I



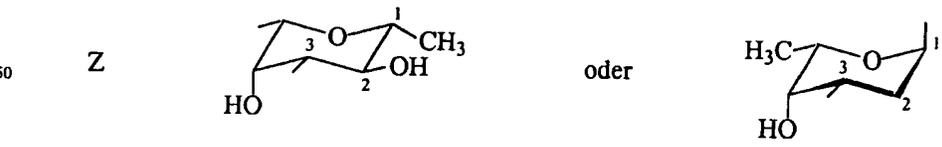
15 in welcher bedeuten:  
 B ein in  $\alpha$ -1,4-Verknüpfung verbundenes Polysaccharid, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxymethylstärke, Hydroxyethylstärke, Hydroxypropylstärke, lösliche Amylose und lösliches Amylopektin,  
 $R^2, R^3, R^4$  unabhängig voneinander H oder  $(CH_2)_n-OH$ , mit  $n = 1$  bis 3 mit den Bedingungen, daß  
 B Amylose oder Amylopektin ist, wenn  $R^2 = R^3 = R^4 = H$   
 B Hydroxymethylstärke ist, wenn  $n = 1$ ,  
 B Hydroxyethylstärke ist, wenn  $n = 2$ , und  
 B Hydroxypropylstärke ist, wenn  $n = 3$  ist;



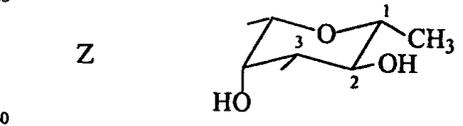
mit  $R^1 = H$  oder OH oder



und

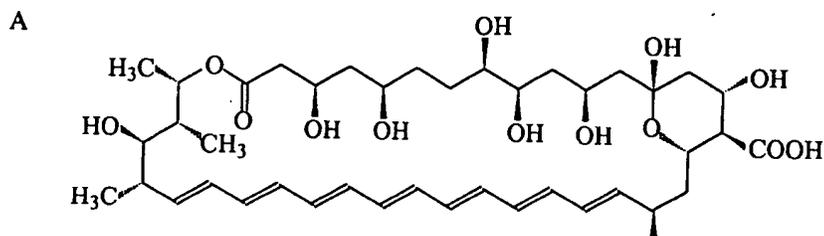


mit der Bedingung, daß wenn

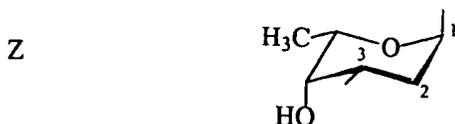


ist, dann ist

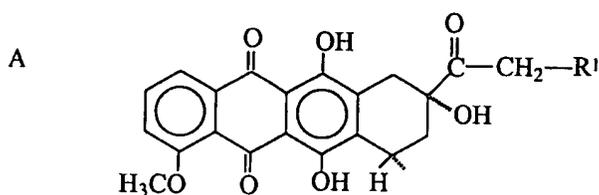
65



und wenn



ist, dann ist



mit  $R^1 = H$  oder  $OH$

wobei der Polysaccharidanteil des Konjugats mit der Aminogruppe an  $C_3$  des Aminozuckers des Antibiotikums unter Ausbildung einer Peptidbindung verknüpft ist.

2. Antibiotikum-Derivat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Molverhältnis zwischen dem Antibiotikum- und Polysaccharidanteil 1 : 1 ist.
3. Antibiotikum-Derivat nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Polysaccharidanteil aus Hydroxyethylstärke besteht.
4. Antibiotikum-Derivat nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das mittlere Molekulargewicht der Hydroxyethylstärke im Bereich zwischen 2000 und  $2 \cdot 10^6$  Dalton liegt.
5. Antibiotikum-Derivat nach den Ansprüchen 3 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxyethylstärke einen mittleren Polymerisationsgrad von mindestens 15 aufweist.
6. Antibiotikum-Derivat nach den Ansprüchen 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das mittlere Molekulargewicht der Hydroxyethylstärke  $> 70000$  Dalton ist.
7. Antibiotikum-Derivat nach den Ansprüchen 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxyethylstärke ein mittleres Molekulargewicht von 130.000 Dalton und einen Substitutionsgrad  $MS$  im Bereich von 0,1 bis 0,8 aufweist.
8. Antibiotikum-Derivat nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxyethylstärke einen Substitutionsgrad  $MS$  im Bereich von 0,3 bis 0,5 aufweist.
9. Antibiotikum-Derivat nach jedem der Ansprüche 3 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxyethylstärke ein  $C_2/C_6$ -Substitutionsverhältnis im Bereich von 2 bis 12 aufweist.
10. Antibiotikum-Derivat nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxyethylstärke ein  $C_2/C_6$ -Substitutionsverhältnis im Bereich von 5 bis 11 aufweist.
11. Antibiotikum-Derivat nach jedem der Ansprüche 3 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxyethylstärke unverzweigt in  $\alpha$ -1,4-glykosidischer Verknüpfung vorliegt.
12. Antibiotikum-Derivat nach jedem der Ansprüche 3 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxyethylstärke verzweigt mit  $\alpha$ -1,4-glykosidischer Verknüpfung und  $\alpha$ -1,6-glykosidischer Verknüpfung vorliegt.
13. Antibiotikum-Derivat nach jedem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Antibiotikum Amphotericin B ist.
14. Antibiotikum-Derivat nach jedem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Antibiotikum Daunorubicin ist.
15. Antibiotikum-Derivat nach jedem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Antibiotikum Doxorubicin ist.
16. Verfahren zur Herstellung eines Antibiotikum-Polysaccharid-Konjugats nach jedem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, das Polysaccharid an seinem reduzierenden Ende in wässriger alkalischer Lösung unter Ausbildung eines Lacton-Rings oxidiert wird und das erhaltene Produkt zusammen mit dem einen Aminozucker aufweisenden Antibiotikum zur Bildung eines Antibiotikum-Polysaccharid-Konjugats in einem organischen Lösungsmittel reagieren gelassen wird.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Oxidation des Polysaccharids am reduzierenden Ende mit  $J_2$  erfolgt.
18. Verfahren nach den Ansprüchen 16 und 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplung des oxidierten Polysac-

# DE 101 29 369 C 1

charids an das Antibiotikum in einem organischen Lösungsmittel erfolgt.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß als organisches Lösungsmittel Dimethylsulfoxid eingesetzt wird.

5 20. Verwendung des Antibiotikum-Derivats gemäß Anspruch 13 zur systemischen Behandlung mykotischer Infektionen.

21. Verwendung des Antibiotikum-Derivats gemäß Anspruch 14 und/oder 15 zum Einsatz in der Krebstherapie.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65